Rev. Real Acad. Canar. Cienc., Vol. XXVI, 251-262 (diciembre de 2014)

EFECTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN LA FERTILIZACIÓN Y EMBRIOGÉNESIS DE *Paracentrotus lividus*

González-Delgado, S., Hernández, J.C., *García, E. & Clemente, S.
Grupo de investigación en Biodiversidad, Ecología Marina y Conservación (BIOECOMAC)
Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología, Universidad de La Laguna
* Autor de correspondencia: eliseba8@hotmail.com

RESUMEN

El cambio climático trae consigo problemas como el calentamiento y la acidificación de los océanos que pueden producir efectos significativos sobre los organismos y ecosistemas marinos. El objetivo del presente trabajo es conocer cómo afecta la combinación de estos dos estresores a la fertilización y el desarrollo embrionario temprano del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. Se realizó un experimento donde se manipularon simultáneamente el pH y la temperatura del agua de mar. Para ello, las variables estudiadas fueron la tasa de fecundación y la tasa de división celular en tres tiempos diferentes después de la inseminación. Los resultados obtenidos muestran una cierta tolerancia de la especie a los futuros escenarios de cambio climático. Sin embargo, estudios previos han encontrado efectos más severos en etapas más avanzadas del desarrollo embrionario. Por ello es necesario seguir realizando investigaciones, valorando los efectos combinados de los estresores, en otras fases del ciclo de vida de la especie objeto de estudio.

Palabras claves: acidificación de los océanos, calentamiento global, desarrollo embrionario, erizo de mar, *Paracentrotus lividus*.

ABSTRACT

Climate change creates problems since global warming and ocean acidification can produce significant effects on marine organisms and ocean ecosystems. The aim of this study was to determine how the combination of these two stressors affects fertilization and early embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. An experiment with a simultaneous manipulation of the pH and temperature was carried out. In order to do this, the studied variables were fertilization and cell division rates at three different times after insemination. Results showed some tolerance of the species to future climate change scenarios. However, previous studies have found more severe effects at later stages of early embryonic development. In this sense, further research assessing the combined effects of stressors in other life cycles phases is needed.

Keywords: ocean acidification, global warming, embryonic development, sea urchin, *Paracentrotus lividus*.

1. INTRODUCCIÓN

Con la llegada de la Revolución Industrial las emisiones de CO_2 a la atmosfera han aumentado en torno a un 80% (IPCC, 2013) principalmente debido al uso de combustibles fósiles. Esto, junto con el aumento de otros gases contaminantes, ha provocado un proceso de cambio global en las condiciones medioambientales que es lo que denominamos el cambio climático. Entre los principales problemas derivados de los procesos de cambio climático en el medio marino destacan, por sus efectos en la fisiología y distribución de los organismos marinos, el calentamiento y la acidificación de los océanos.

El calentamiento global no sólo provoca el deshielo de los casquetes polares y en consecuencia el aumento del nivel del mar, sino además un progresivo aumento de la temperatura de los océanos. El océano ha absorbido más de un 80% del calor incorporado al sistema climático y, en consecuencia, la temperatura media del mar ha aumentado unos 0,6°C en los últimos 100 años (IPCC, 2013). Se espera que para el año 2100 la temperatura superficial del mar (SST) se incremente de 0,3 a 4,8°C (IPCC, 2013).

El proceso de acidificación de los océanos consiste en una progresiva disminución del pH del agua de mar por la absorción del CO_2 antropogénico liberado a la atmosfera. La incorporación de este carbono ha provocado que el pH disminuya 0,1 unidades en las últimas décadas (IPCC, 2013) y se espera una mayor reducción del pH en el futuro. Las predicciones apuntan hacia una disminución del pH de la superficie del mar de 0,4 unidades para el año 2100 (IPCC, 2013) y de 0,7 unidades para el 2300 (CALDEIRA & WICKET, 2003; ORR *et al.* 2005).

La acidificación de los océanos afecta sobre todo a los invertebrados que poseen estructuras calcáreas (conchas, esqueletos, espículas, etc). Esto es debido a que cuando el CO_2 se disuelve en el mar reduce el pH y se forman ácidos que liberan átomos de hidrógeno, que luego se combinan con moléculas de carbono originando bicarbonato (HCO_3), disminuyendo de este modo la formación de minerales de $CaCO_3$ (DONEY *et al.* 2009) necesarios para la formación de los caparazones y esqueletos de los organismos calcificantes (RIES, 2011).

Los efectos directos del calentamiento y la acidificación del mar en los organismos marinos son cada vez más conocidos (KROEKER *et al.* 2010; BYRNE *et al.* 2011), pero la información sobre los efectos combinados de estos dos estresores climáticos es mucho más escasa. Los estudios que valoran los efectos de la interacción del aumento de la temperatura y la disminución del pH del mar son mucho más realistas, ya que en el medio los organismos marinos se enfrentan a la presión combinada del calentamiento y la acidificación de los océanos (DONEY *et al.* 2012). Estos factores determinan en gran medida la distribución, la fisiología, la morfología y el comportamiento de los organismos (DONEY *et al.* 2009).

En los invertebrados marinos, las primeras etapas de desarrollo (fertilización, embriogénesis y desarrollo larvario) son las más sensibles al estrés ambiental que los estados posteriores del ciclo de vida (DUPONT & THRORNDYKE, 2009). En el caso concreto de los equinodermos, se trata de especies con estructuras calcáreas que son utilizadas ampliamente como modelos para estudiar los efectos del cambio climático sobre los procesos fisiológicos tales como la respiración, la alimentación, fertilización y el desarrollo larvario (KURIHARA & SHIRAYAMA, 2004; DUPONT & THRORNDYKE, 2008). Además, en concreto los erizos de mar son herbívoros clave en muchos ecosistemas costeros, esenciales para el mantenimiento de la estructura y funcionalidad de los ecosistemas bentónicos, por lo que su estudio tiene implicaciones que van desde los procesos fisiológicos que ocurren en el organismo a cambios a nivel de ecosistema (PAINE, 1966; HARROLD & PEARSE, 1987; LEBLANC *et al.* 2005; HERNÁNDEZ *et al.* 2008).

Como la mayoría de los invertebrados marinos, los erizos de mar liberan sus gametos a la columna de agua donde se produce la fecundación. Cuando las condiciones físico-químicas del agua de mar cambian, sus gametos se ven expuestos a una variedad de factores estresantes, tanto naturales como antropogénicos, que pueden comprometer las primeras etapas de desarrollo, por ejemplo limitando la capacidad de generar estructuras calcáreas (KURIHARA & SHIRAYAMA, 2004; MELZNER *et al.* 2009). Estudios previos han mostrado efectos positivos del calentamiento en la fecundación (HAGSTRÖM & HAGSTRÖM, 1959; MITA *et al.* 1984), así como efectos negativos en el desarrollo larvario (BYRNE *et al.* 2011). Los efectos adversos de la acidificación sobre la fertilización y el desarrollo temprano también se han demostrado en ciertas especies de equinoideos (KURIHARA & SHIRAYAMA, 2004; DUPONT *et al.*, 2008; HAVENHAND *et al.*, 2008; CLARK *et al.*, 2009; MARTIN *et a*l., 2011; MOULIN *et al.*, 2011), con la excepción de un estudio que no encontró efecto del pH sobre la fertilización de erizo de mar, concretamente en la especie *Heliocidaris erythrogramma* (Valenciennes, 1846) (BYRNE *et al.* 2009). En el caso de la especie *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1819), se han demostrado efectos antagonistas sobre la fertilización y el desarrollo temprano producidos por el calentamiento del agua, que tienden a acelerar estos procesos, y la acidificación, que retrasa el desarrollo temprano (COHEN *et al.*, 2013). Sin embargo, son aún pocos los estudios que han evaluado los efectos combinados de la temperatura y el pH del mar aunque muy necesarios dadas las interacciones que otros autores han encontrado (BYRNE *et al.* 2009; SHEPPARD-BRENNAND *et al.* 2010; BYRNE *et al.* 2010 a & b).

En el presente trabajo, se estudió el efecto de las variables de cambio climático (temperatura y pH) en el desarrollo temprano del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. Esta especie de apetencias templadas se distribuye por toda la costa Mediterránea y el este del Océano Atlántico Norte (desde Marruecos a Escocia), incluyendo a las islas Canarias. Se suele encontrar en hábitats rocosos, tanto en zonas del intermareal como del submareal somero (BOUDOURESQUE & VERLAQUE, 2001). En Canarias esta especie encuentra su límite meridional donde la temperatura superficial del mar (SST) oscila entre 19-25 °C (HERNÁNDEZ *et al.* 2009) contrastando con los 13-28 °C del Mediterráneo oriental (NYKJAER, 2009), lo que sugiere que esta población podría ser más susceptible a los procesos de cambio climático (COHEN *et al.* 2013). El objetivo concreto planteado para este trabajo fue conocer el efecto combinado de los aumentos previstos en la temperatura y en la acidificación del mar en la fecundación y desarrollo temprano de las poblaciones de *P. lividus* de las islas Canarias.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. *Condiciones del laboratorio y parámetros del agua de mar*
Se manipuló la temperatura y el pH del agua de mar, para utilizar ambos parámetros como factores estresores combinados en experimentos manipulativos en el laboratorio. Para la realización del experimento se utilizaron cuatro tanques que se llenaron de agua de mar filtrada mediante un sistema de recirculación de agua provisto de filtros de carbono activo (DRYDEN AQUA); filtros de poliamida de 50 µm, 10 µm y 1 µm (UNICEL); así como un sistema de purificación por luz ultravioleta (UV-C AQUAEL, 11W) (Fig. 1A). En cada tanque, la temperatura se controló mediante unos termostatos (EHEIM AQUATICS, 50 W) de forma que un tanque se mantuvo a 19 °C (temperatura típica de Primavera en las islas Canarias), otro a 21 °C (temperatura máximas registradas excepcionalmente en Primavera en las

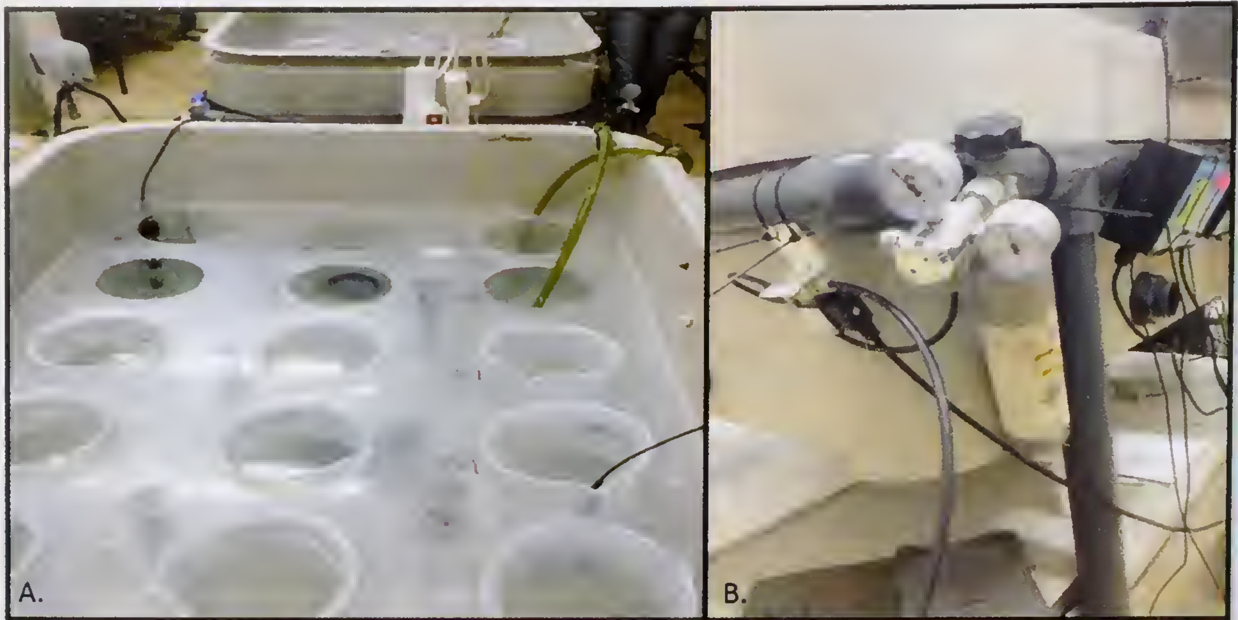


Figura 1.- A. Tanque que contiene los recipientes experimentales con agua de mar filtrada mediante un sistema de recirculación de agua provisto de filtros. **B.** Sistema de computación y válvula solenoide (AquaMedic) para el control del CO_2.

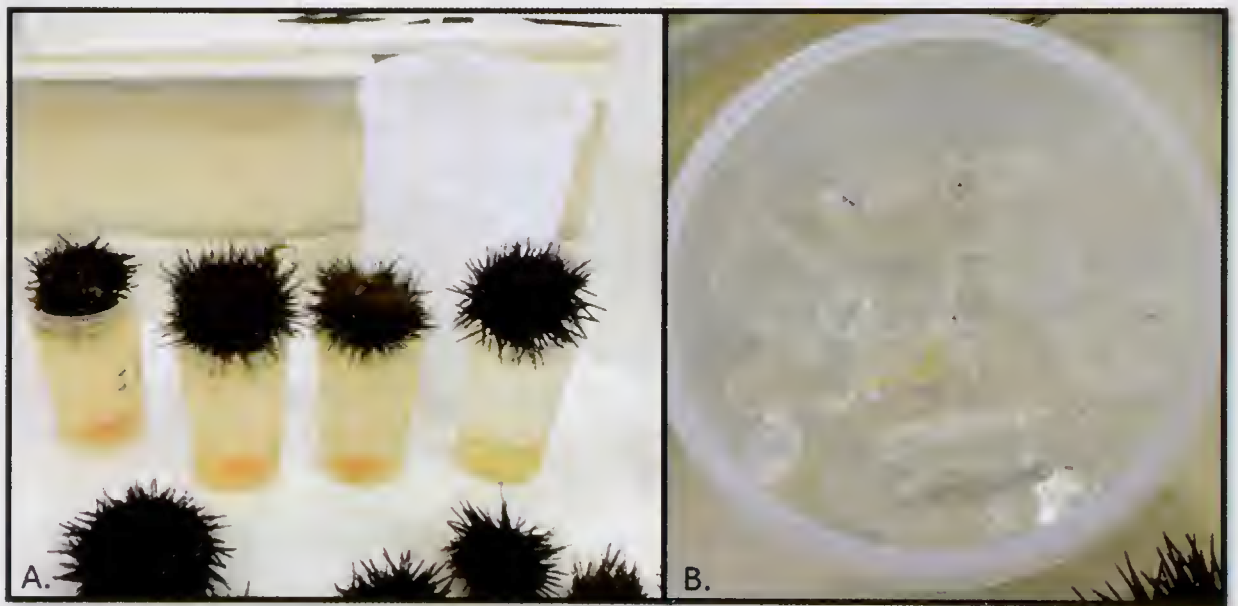


Figura 2.- A. Desove de las hembras en un bote de 100 ml. **B.** Tubos eppendorf con esperma en hielo.



Figura 3.- Imagen de los diferentes estadios de división celular observados al microscopio óptico: NF (no fertilizado), F (con membrana de fertilización), 2C (con 2 células), 4C (con 4 células) y +4C (con más de 4 células).

islas), otro a 23 °C (temperatura estimada para el año 2050; IPCC, 2013) y un tanque a 25 °C (valor estimado para el 2100; IPCC, 2013). El pH del agua de mar se controló mediante un sistema de computación y válvula solenoide (AquaMedic) que burbujea CO_2 directamente en el agua con una resolución de ±0,01 unidades (Fig. 1B). Se ajustó el pH y se mantuvo controlado con un sensor y un ordenador de pH, de tal manera que se establecieron tres tratamientos diferentes: 8,1 (considerado como control, es el pH al que se encuentra el agua de mar de las islas Canarias), 7,7 (pH estimado para el año 2100; IPCC, 2013) y 7,4 (valor estimado para el año 2300; IPCC, 2013) (Fig.1A). Para verificar el mantenimiento correcto de las variables experimentales, se realizó un seguimiento diario de la temperatura y el pH del agua de mar en los experimentos mediante un sensor de temperatura y pH (Metrohm mobile meter). La salinidad se controló mediante un conductímetro de mano (COND 315i).

2.2. *Recolección de especímenes y bioensayos*
La especie objeto de este estudio fue el erizo de mar *Paracentrotus lividus*. Los individuos se recolectaron en noviembre de 2013 en las Galletas, en la isla de Tenerife (Coordenadas: Latitud 28° 16' 07" N, Longitud 16° 36' 20" W). Para controlar cualquier variabilidad espacial se escogieron de manera aleatoria 5 hembras y 4 machos (EVAN & MARSHALL, 2005) a los que se le administró una inyección de 2 ml de KCl en la cavidad perivisceral para inducir el desove. Las hembras desovaron en un bote de 100 ml (Fig. 2A), mientras que a los machos se les extrajo el esperma mediante una pipeta. El esperma se introdujo en un tubo eppendorf y se mantuvo en hielo hasta su utilización (Fig. 2B).

Los huevos y el esperma se mezclaron para la fertilización en botes de 100 ml en cantidades de 1:1500 (huevo:esperma) en las condiciones de pH experimentales y se colocaron en los tanques con las condiciones de temperatura deseadas. Por cada pH y temperatura se utilizaron nueve réplicas que se mantuvieron por un tiempo determinado después de producida la inseminación: 15 min, 105 min y 210 min. De esta forma pudimos observar el desarrollo embrionario de la especie y sus diferentes estadios. Así, se obtuvieron tres réplicas por cada combinación de factores, temperatura, pH y tiempo tras la inseminación. Después de que las réplicas se sometieran a las condiciones experimentales durante el tiempo establecido, se paró el desarrollo larvario usando formaldehído al 4%, 1 ml por cada vaso de 100 ml.

Para evaluar la tasa de desarrollo embrionario se estimó el número de huevos en los diferentes estadios de división celular: no fertilizados, células con membrana de fertilización, embriones con 2 células, con 4 células y con más de 4 células (Fig. 3). Para ello, de cada réplica se sacaron 3 alícuotas de 0,2 ml para su observación y cuantificación al microscopio.

2.3. *Análisis de los datos*
Con los datos obtenidos se realizó un análisis multivariante de la varianza por permutaciones (PERMANOVA) (ANDERSON, 2001), para evaluar los efectos combinados de la temperatura del agua de mar y el pH sobre la tasa de desarrollo embrionario y división celular de *Paracentrotus lividus*. Se utilizó un diseño de 3 vías con los factores fijos "Temperatura" (4 niveles de variación), "pH" (3 niveles de variación) y "tiempo post-inseminación" (3 niveles de variación). Se utilizaron las distancias euclídeas de las 5 variables estudiadas para valorar el desarrollo embrionario del erizo: huevos no fecundados, huevos con membrana de fertilización, embriones de 2 células, de 4 células y de más de 4 células. Los términos significativos del modelo se analizaron con comparaciones *a posteriori* dos a dos ejecutadas por permutaciones (ANDERSON, 2001). Cuando no se obtuvieron suficientes permutaciones para una prueba válida, los p-valores se corrigieron con el método de Monte Carlo. Final-

mente, se realizó un análisis de ordenación de coordenadas principales (PCO) para identificar las diferencias y similitudes de las muestras.

Todos los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico PRIMER 6 & PERMANOVA + v. 1.0.1.

3. RESULTADOS.

Según el análisis PERMANOVA de las 5 variables de desarrollo embrionario de *Paracentrotus lividus* estudiadas (proporción de huevos no fecundados, huevos con membrana de fertilización, embriones de 2 células, de 4 células y de más de 4 células) la interacción de factores, "Temperatura x pH x Tiempo" fue significativa (Tabla 1). Este resultado demuestra que la tasa de huevos en diferentes etapas de desarrollo varía de una manera distinta según la combinación de los diferentes tratamientos de Temperatura, pH y Tiempo analizados. Por lo tanto, fue necesaria la realización de comparaciones *a posteriori* por pares para determinar las diferencias entre niveles de cada uno de estos factores. Así, se encontraron diferencias en el desarrollo embrionario de la especie entre las temperaturas, sobre todo a los 105 min de la fertilización donde aparecieron diferencias en todos los niveles de pH estudiados, y en menor medida, a los 210 min post-inseminación (Tabla 2). Por otro lado, se encontraron diferencias entre los niveles de pH considerados sobre todo a temperaturas bajas (19 °C y 21 °C) y en las etapas más avanzadas de desarrollo embrionario (105 min y 210 min) (Tabla 3).

Mediante el análisis de ordenación de PCO observamos los resultados de una manera más global (Fig. 4). La ordenación de las muestras pone de manifiesto patrones de variación claros de las muestras según el tiempo transcurrido tras la inseminación. Además se observa, que a los 15 min post-inseminación, las muestras sometidas a pH bajo (7,4), presentan un mayor número de huevos sin fecundar. A los 105 min de la fertilización en la ordenación se aprecia una diferencia entre las muestras mantenidas a 19 °C y el resto, especialmente a pH bajo, existiendo un mayor número de huevos fecundados que muestran membrana de fertilización, que de huevos con 2 células; por lo tanto, en estas condiciones experimentales de baja temperatura y pH ácido el desarrollo embrionario se ralentizó. En el grupo de los 210 min observamos diferencias más claras en el desarrollo embrionario de las muestras según las temperaturas experimentales; las muestras sometidas a la temperatura más bajas (19 °C) y el pH más bajo (7,4) presentaron una mayor proporción de huevos en estadios menos desarrollados (huevos con 2 células) que el resto, mientras que con las temperaturas más altas (23 °C y 25 °C) se encontró un mayor número de huevos en etapas más avanzadas de desarrollo embrionario (huevos de más de 4 células). En general, cuanto más bajo fue el pH mayor fue la proporción de huevos sin fecundar a los 15 min del desarrollo embrionario y mayor la proporción de huevos con membrana de fertilización sin escisión a los 105 y a los 210 min. Sin embargo, las altas temperaturas provocaron un aumento de la proporción de huevos en etapas más avanzadas del desarrollo embrionario (uno, dos o más divisiones), contrarrestando así el efecto del pH.

4. DISCUSIÓN

Este estudio demuestra la capacidad de *Paracentrotus lividus* para soportar los efectos combinados de la disminución de los niveles de pH y el aumento de las temperatura en el agua de mar causados por los procesos del cambio climático que se esperan para un futuro próximo.

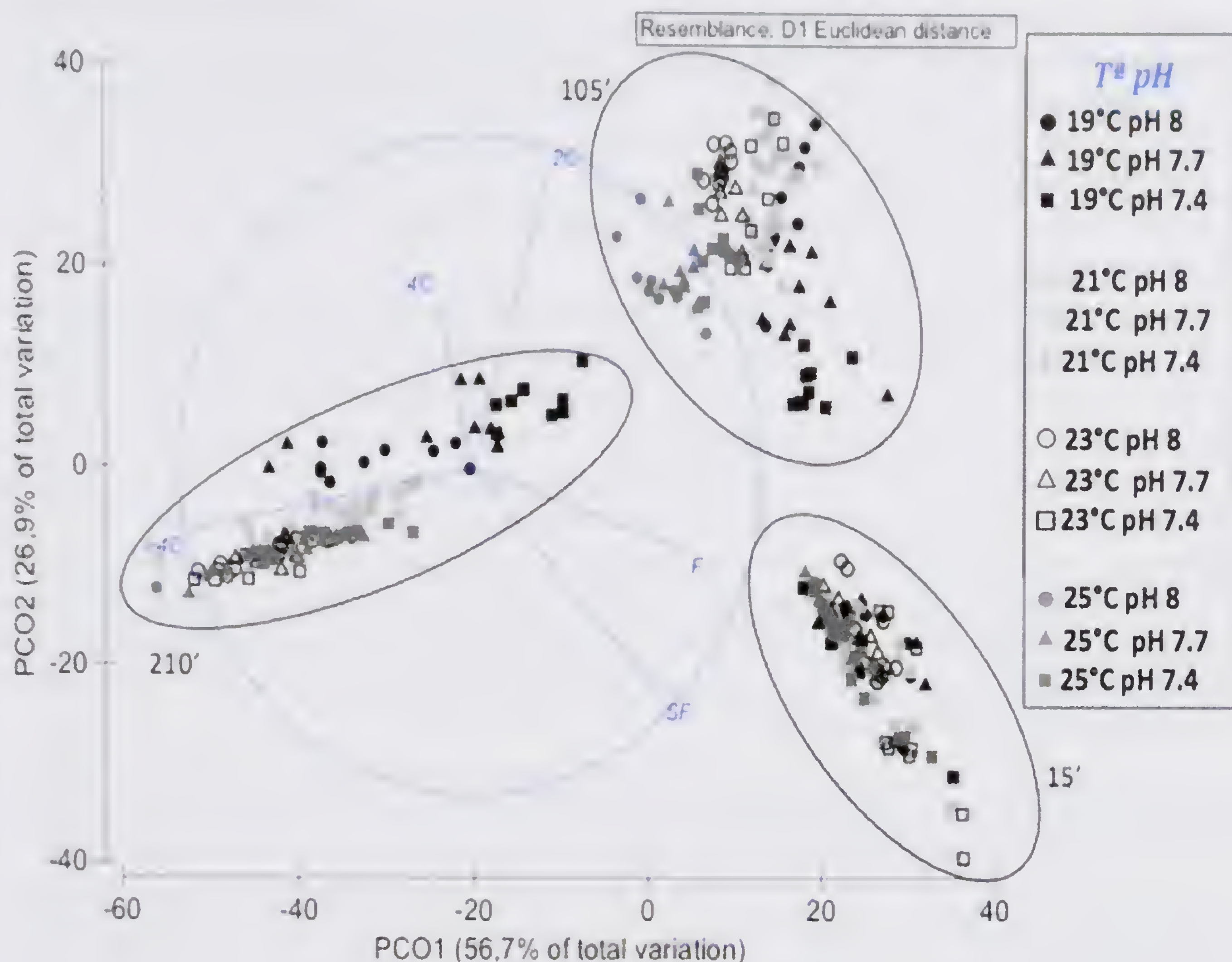


Figura 4.- Ordenación de Componentes Principales (PCO) que muestra el efecto combinado de la temperatura y pH del agua de mar sobre tasa de escisión de *Paracentrotus lividus* a 15, 105 y 210 minutos después de la inseminación.

El desarrollo embrionario de la especie mostró tolerancia al aumento de la temperatura y disminución del pH del agua de mar, produciéndose los procesos de fertilización y división celular temprana en todas las combinaciones de pH y temperatura estudiadas. Sin embargo, se registró un retraso en el desarrollo embrionario en las condiciones de menor pH con temperaturas óptimas para la especie de 19-21 °C, en concordancia con estudios anteriores (MOULIN *et al.* 2010; COHEN *et al.* 2013), mientras que otros sólo lo han registrado a niveles de pH extremadamente bajos (7,0) (MARTIN *et al.* 2011). Este efecto negativo del pH sobre el desarrollo embrionario temprano de *P. lividus* mejoró con el aumento de las temperaturas, llegando incluso a desaparecer con las temperaturas más altas (23 y 25°C) apareciendo una mayor proporción de huevos en estadios avanzados.

Trabajos previos han obtenido resultados variables en los estudios del efecto del calentamiento y la acidificación del agua de mar sobre *P. lividus*. En cuanto a los efectos del pH del agua de mar, MOULIN et al. (2010) observó una reducción en la fecundación, así como una mayor sensibilidad en el desarrollo temprano de esta especie a rangos de pH < 7,6. COHEN et al. (2013) obtuvieron resultados incluso más negativos del efecto de la acidificación del agua de mar, manifestándose en un retraso significativo en la fecundación pero sin llegar a observarse problemas en la viabilidad de los gametos. Al contrario, en los resultados

de MARTIN et al. (2011) no se observaron efectos significativos sobre la fecundación de *P. lividus* en condiciones de pH superiores a 7,0, los autores sólo observaron un ligero retraso en el desarrollo, lo que puede deberse a las condiciones experimentales con temperaturas relativamente más altas que en el resto de estudios (20 °C) (COHEN *et al.* 2013). Considerando el efecto del aumento de la temperatura sobre *P. lividus*, se ha demostrado previamente una aceleración en la fecundación y una mejora en el desarrollo temprano de la especie (COHEN *et al.* 2013).

La novedad del presente estudio radica en la combinación de los efectos del calentamiento y la acidificación del agua de mar, considerados ambos factores estresores de forma conjunta. En nuestros resultados, se observó claramente un retraso de la fertilización y de las primeras etapas de desarrollo embrionario de *P. lividus*, provocado por la disminución del pH, más concretamente por el pH 7,4, valor pronosticado para el año 2300 si las condiciones de cambio climático se mantienen (IPCC, 2013). Sin embargo, este efecto se vio amortiguado por el aumento de las temperaturas del agua, sobre todo por las temperaturas más altas (23 y 25 °C). Por lo tanto, estos resultados resaltan el efecto conjunto de ambas variables ambientales en la viabilidad de las especies marinas y la necesidad de la consideración de ambos parámetros de forma conjunta en futuros diseños experimentales encaminados a valorar las consecuencias del cambio climático.

La fecundación externa es una de las principales etapas que determinan el número de individuos que llegaran a estadio adulto, por tanto, es una etapa crucial para el mantenimiento de las poblaciones de equinoideos donde influyen multitud de factores ambientales que determinan la selección natural de las distintas especies. Cuando aumenta la temperatura del mar se produce un aumento de la motilidad de los espermatozoides debido a una disminución de la viscosidad del agua (HAGSTRÖM & HAGSTRÖM, 1959; BYRNE *et al.* 2009; COHEN *et al.* 2013), esto puede favorecer la fertilización y explicar una aceleración del desarrollo embrionario del erizo. Por otra parte, el hecho de que la disminución del pH solo tenga efectos destacados a niveles de pH 7,4 puede ser por la propia tolerancia de los espermatozoides a niveles de pH bajo. Se sabe que un pH bajo del agua de mar disminuye el pH interno de los espermatozoides, favoreciendo la motilidad de estos (CHRISTEN *et al.* 1986). Al contrario, en el desarrollo temprano, una vez que se ha producido la fecundación, se produce el embrión un aumento del pH intracelular que favorece la síntesis de proteínas, la replicación del DNA, y los movimientos citoplasmáticos del material morfogenético. Cambios de los niveles de pH extracelular puede afectar al pH intracelular, que puede explicar el retraso observado en las primeras etapas de desarrollo a temperaturas bajas (19 y 21 °C) (CIAPA & PHILIPPE, 2013).

Este estudio demuestra que el erizo de mar *P. lividus* es una especie tolerante a los futuros escenarios de cambio climáticos predichos por el IPCC (2013). Sin embargo, únicamente se ha analizado el desarrollo embrionario temprano, por lo que los efectos encontrados en etapas más avanzadas como los estadios larvarios pueden ser más severos para su supervivencia (MOULIN *et al.* 2010; MARTIN *et al.* 2011; COHEN *et al.* 2013). Asimismo, el aumento de las temperaturas y la disminución de pH del agua de mar, no son los únicos factores de estrés que pueden afectar a los organismos marinos, existen otras condiciones ambientales como la variación de la salinidad del mar, o la aparición de especies invasoras, que actúan en sinergia con los procesos de cambio climático.

Para bien o para mal, el calentamiento y la acidificación de los océanos provocados por el cambio climático, afectarán a los organismos marinos produciendo un desequilibrio en los ecosistemas, ya sea por la proliferación de una especie o la reducción de otras. Es necesario seguir realizando investigaciones de los efectos del cambio climático sobre los organismos que

componen el medio marino de una manera conjunta, analizando el efecto combinado de los estresores de cambio climático y estudiando los cambios futuros que pueden aparecer en las relaciones entre organismos, el propio medio e incluso con el ser humano.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer al Proyecto 'ACIDROCK' del Ministerio de Economía y Competitividad que ha subvencionado este trabajo de Grado en Biología.

6. BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON, M.J. 2001. Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58: 626-639.

BOUDOURESQUE, C. F., & M. VERLAQUE. 2001. Ecology of *Paracentrotus lividus*. In: Lawrence, J.M. (Ed.), Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. *Elsevier, Amsterdam, pp*. 177–216.

CIAPA, B. & PHILIPPE L. 2013. Intracellular and Extracellular pH and Ca Are Bound to Control Mitosis in the Early Sea Urchin Embryo via ERK and MPF Activities. PLoS ONE 8(6): e66113. doi:10.1371/journal.pone.0066113.

BYRNE M., M. HO, P. SELVAKUMARASWAMY, H. NGUYEN, S. DWORJANYN & A. DAVIS. 2009. Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early developement under near-future climate change scenarios. *Proceedings of the Royal Society of London* B, 279: 1883-1888.

BYRNE, M., N. SOARS, M. HO, E. WONG, D. MCELROY, P. SELVAKUMARASWAMY, S. DWORJANYN & A. DAVIS. 2010a. Fertilization in a suite of coastal marine invertebrates from SE Australia is robust to near-future ocean warming and acidification. *Marine Biology*, 157: 2061-2069.

BYRNE, M., N. SOARS, P. SELVAKUMARASWAMY, S. DWORJANYN & A. DAVIS. 2010b. Sea urchin fertilization in a warm, acidified and high pCO2 ocean across a range of sperm densities. *Marine Environmental Research*, 69: 234-239.

BYRNE, M., P. SELVAKUMARASWAMY, M. HO & H.D. NGUYEN 2011. Sea urchin development in a global change hot spot, potential for southerly migration of thermotolerant propagules. *Deep-Sea Research II*, 58, 712–719.

CALDEIRA, K. & M. WICKET 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425: 365.

CHRISTEN, R., R.W. SCHACKMANN & B.M. SHAPIRO. 1986. Ionic regulation of sea urchin sperm motility, metabolism and fertilizing capacity. *J. Physiol*. 379, 347–365.

CLARK, D., M. LAMARE & M. BARKER. 2009. Response of sea urchin pluteus larvae (Echinodermata: Echinoidea) to reduced seawater pH: a comparison among a tropical, temperate, and a polar species. *Marine Biology*, 156: 1125-1137.

COHEN, M., E. GARCÍA, C.A. HERNÁNDEZ, J.C. HERNÁNDEZ & S. CLEMENTE. 2013. Global warming and ocean acidification affect fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*, 54: 1-9.

DONEY, S., V. FABRY, R. FEELY & J. KLEYPAS. 2009. Ocean acidification: the other CO2 problem. *Annual Review of Marine Science*, 1: 169-192.

DONEY, S.C., M. RUCKELSHAUS, J.E. DUFFY, J.P. BARRY & OTHERS. 2012. Climate change impacts on marine ecosystems. *Annu Rev Mar Sci* 4: 11-37.

DUPONT, S. & M. THORNDYKE. 2008. Ocean acidification and its impact on the early life-history stages of marine animals. En: *Impacts of acidification on biological, chemical and physical systems in the Mediterranean and Black Seas*. Ed. F. Briand, *CIESM Monographs*, Monaco, 36: 89-97 pp.

DUPONT, S., J. HAVENHAND, W. THORNDYKE, L. PECK & M. THORNDYKE. 2008. CO2-driven ocean acidification radically affect larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*. *Marine Ecology Progress Series*, 373: 285-294.

DUPONT, S. & M. THORNDYKE. 2009. Impact of CO2-driven ocean acidification on invertebrates early life-history – what we know, what we need to know and what we can do. *Biogeosci. Discuss*. 6, 3109-3131.

EVANS, J. & D. MARSHALL. 2005. Male-by-female interactions influence fertilization success and mediate the benefits of polyandry in the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*. *Evolution*, 59: 106-112.

HAGSTRØM, B. & B. HAGSTRØM. 1959. The effect of increases and decreased temperatures on fertilization. *Experimental Cell Research*, 16: 174-183.

HARROLD, C. & J. S. PEARSE. 1987. The ecological role of echinoderms in kelp forests. En: *Echinoderm Studies 2*. Eds. Jangoux, M. & J.M. Lawrence, Balkema, Rotterdam.

HAVENHAND, J.N., F.R. BUTTLER, M.C. THORNDYKE & J.E. WILLIAMSON. 2008. Near-future levels of ocean acidification reduce fertilization success in a sea urchin. *Current Biology*. 18: 651-652.

HERNÁNDEZ, J.C., S. CLEMENTE, C. SANGIL & A. BRITO 2008. The key role of the sea urchin *Diadema* aff. *antillarum* in controlling macroalgae assemblages throughout the Canary Islands (eastern subtropical Atlantic): a spatio-temporal approach. *Marine Environmental Research*, 66: 259–270.

HERNÁNDEZ, J.C., S. CLEMENTE, C. SANGIL & A. BRITO. 2009. La degradación de los fondos marinos en Canarias. *El Indiferente*, 29: 63-71.

IPCC, 2013: CLIMATE CHANGE 2013. *The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Ed. Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex & P.M. Midgley. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.

KROEKER, K.J., R.L. KORDAS, R.N. CRIM & G.G. SINGH. 2010. Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecology Letters*, 13: 1419-1434.

KURIHARA, H. & Y. SHIRAYAMA. 2004. Effects of increased atmospheric CO2 on sea urchin early development. *Marine Ecology Progress Series*, 274: 161-169.

LEBLANC, N., Y. LETOURNEUR, S. RUITTON & C. MARSCHAL. 2005. Impacts à court terme de la concentration expérimentale d'oursins (*Paracentrotus lividus*) sur les autres compartiments benthiques de l'écosystème rocheux infralittoral méditerranéen: mise en évidence «d'effets-cascade»? *Journal Recherche Océanographique* 30, 12–23.

MARTIN, S., S. RICHIER, M.Z. PEDROTTI, S. DUPONT, C. CASTEJON, Y. GERAKIS, M.E. KERROS, F. OBERHÄNSLL, OTHERS. 2011. Early development and molecular

plasticity in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* exposed to CO_2 - driven acidification. *The Journal of Experimental Biology*, 214: 1357-1368.

MELZNER, F., M.A. GUTOWSKA, M. LANGENBUCH, S. DUPONT, M. LUCASSEN, M.C. THORNDYKE, M. BLEICH & H.O. PORTNER. 2009. Physiological basis for high CO2 tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences*, 6: 2313-2331.

MITA, M., A. HINO & I. YASUMASU. 1984. Effects of temperature on interactions between eggs and spermatozoa of sea urchin. *Biology Bulletin*, 166: 68-77.

MOULIN, L., A. CATARINO, T. CLAESSENS & P. DUBOIS. 2010. Effects of seawater acidification on early development of the intertidal sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Marine Pollution Bulletin*, 62: 48-54.

NYKJAER, L. 2009. Mediterranean sea surface warming 1985-2006. *Climate Research*, 39: 11-17.

ORR, J., V. FABRY, O. AUMONT, L. BOPP, S. DONEY, R. FEELY, A. GNANADESIKAN, N. GRUBER & OTHERS. 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437: 681-686.

PAINE, R.T. 1966. Food web complexity and species diversity. *American Naturalist*, 100: 65-75.

RIES, J.B. 2011. Skeletal mineralogy in a high-CO2 world. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 403, 54-64.

SHEPPARD-BRENNAND H., N. SOARS, S. DWORJANYN, A. DAVIS & M. BYRNE. 2010. Impact of ocean warming and ocean acidification on larval development and calcification in the sea urchin *Tripneustes gratilla*. *PLoS ONE*, **5**: e11372.

Tabla 1.- Resultados del análisis PERMANOVA de 3 vías de la tasa de escisión de *Paracentrotus lividus*, incluyendo las cinco variables estudiadas (huevos no fecundados, células con membrana de fertilización, embriones con 2 células, con 4 células y con más de 4 células), T: temperatura, pH, Ti: tiempo después de la inseminación.

Fuente Variación	gl	SC	MC	Pseudo-F	p (perm)
Tª	3	15158	5052,6	50,975	0,001
pH	2	1529,2	764,61	7,7142	0,001
Ti	2	3,20E+05	1,60E+05	1615,8	0,001
TªxpH	6	2598,9	433,15	4,37	0,001
Tªxt	6	42144	7024,1	70,866	0,001
pHxt	4	3842,5	960,63	9,6918	0,001
TªxpHxt	12	5254,2	437,85	4,4174	0,001
Res	288	28546	99,118		
Total	323	4,19E+05			

Tabla 2.- Resultados de los análisis *a posteriori* dos a dos que examinan la interacción significativa de los factores de "Temperatura x pH x tiempo después de la inseminación" por pares de los niveles del factor Temperatura, obtenidos en el análisis PERMANOVA de la tasa de escisión de *Paracentrotus lividus.*

		15 min		105 min		210 min	
pH		**t**	**p(perm)**	**t**	**p(perm)**	**t**	**p(perm)**
8	19°C vs 21°C	1,8624	0,064	3,716	0,001	4,0683	0,001
	19°C vs 23°C	0,52938	0,697	5,7052	0,001	5,314	0,001
	19°C vs 25°C	1,7855	0,008	10,351	0,001	4,8275	0,001
	21°C vs 23°C	2,9719	0,004	7,5814	0,001	0,14516	0,024
	21°C vs 25°C	3,4991	0,002	8,4137	0,001	1,8212	0,062
	23°C vs 25°C	2,4235	0,065	14,122	0,001	2,2597	0,96
7,7	19°C vs 21°C	1,146	0,272	4,0544	0,001	4,6294	0,001
	19°C vs 23°C	0,61659	0,605	6,1557	0,001	6,5648	0,001
	19°C vs 25°C	1,42	0,137	8,3375	0,001	5,8566	0,001
	21°C vs 23°C	1,2751	0,21	4,6634	0,001	2,1189	0,033
	21°C vs 25°C	3,8043	0,001	8,4711	0,001	1,699	0,531
	23°C vs 25°C	4,1437	0,001	10,772	0,001	0,70083	0,087
7,4	19°C vs 21°C	0,59186	0,678	7,1415	0,001	8,6771	0,001
	19°C vs 23°C	1,5872	0,119	8,5276	0,001	13,755	0,001
	19°C vs 25°C	1,5149	0,123	13,271	0,001	9,8558	0,001
	21°C vs 23°C	1,4279	0,162	3,429	0,001	6,0218	0,001
	21°C vs 25°C	1,8034	0,049	6,0668	0,001	2,7202	0,005
	23°C vs 25°C	1,1818	0,255	9,7487	0,001	2,549	0,016

Tabla 3.- Resultados de los análisis *a posteriori* dos a dos que examinan la interacción significativa de los factores de "Temperatura x pH x Tiempo después de la inseminación" por pares de los niveles de factor pH, obtenidos en el análisis PERMANOVA de la tasa de escisión de *Paracentrotus lividus.*

		15 min		105 min		210 min	
Temp.		**t**	**P(perm)**	**t**	**P(perm)**	**t**	**P(perm)**
19°C	8 vs 7,7	0,63547	0,636	2,7089	0,004	1,8107	0,046
	8 vs 7,4	1,7401	0,337	6,4384	0,001	4,8356	0,001
	7,7 vs 7,4	0,98877	0,066	2,4413	0,008	2,571	0,009
21°C	8 vs 7,7	3,4638	0,002	3,5432	0,001	1,106	0,27
	8 vs 7,4	2,8734	0,058	4,4161	0,001	3,1101	0,003
	7,7 vs 7,4	1,7571	0,004	1,8484	0,046	2,9096	0,008
23°C	8 vs 7,7	0,88221	0,431	1,9785	0,022	0,47313	0,448
	8 vs 7,4	1,8056	0,089	2,2917	0,009	0,79162	0,704
	7,7 vs 7,4	1,8901	0.056	1,5513	0,099	1,1958	0,243
25°C	8 vs 7,7	1,2173	0,229	1,6005	0,117	0,40012	0,756
	8 vs 7,4	3,3503	0,004	3,625	0,001	1,5325	0,138
	7,7 vs 7,4	3,3877	0,002	2,3123	0,004	1,3581	0,186